

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Bescheinigung

Herr Dr. Ingo Klimant in Regensburg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel als Referenzstandard und Phosphoreszenzmarker"

am 15. Juli 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 09 K und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 30. Mai 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 33 104.9

Dzierzon

# Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel als Referenzstandard und Phosphoreszenzmarker

## Zusammenfassung

Das Patent beschreibt die Zusammensetzung, Herstellung und Verwendung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln. Diese Partikel können entweder als interne Phosphoreszenzstandards zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen, oder als Phosphoreszenzmarker zur Markierung und Detektion von Biomolekülen verwendet werden. Phosphoreszenzfarbstoffe werden in inerterForm in feste Materialien eingebaut, das heißt vom Einfluß von chemischen und biologischen Verbindungen in wässrigen Probenbestandteilen abgeschirmt. In dieser eingebauten Form bleiben die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe (spektrales Verhalten, Phosphoreszenzquantenausbeute, Phosphoreszenzabklingzeit und Polarisation) von wechselnden Probenparametern unbeeinflußt.

Als Einbaumatrix werden dichte anorganische Materialien oder organische Polymere ausgewählt, die aufgrund ihrer Struktur die Aufnahme von Biomolekülen kleinen neutralen Molekülen sowie ionischen Verbindungen ausschließen. Insbesondere der störende Einfluß von molekularem Sauerstoff, einem effizienten Phosphoreszenzlöscher, auf Phosphoreszenzmessungen wird auf diese Weise eliminiert. Die Oberfläche der Nano- und Mikropartikel kann mit reaktiven Oberflächen versehen sein, um die kovalente Kopplung von Biomolekülen zu ermöglichen und das Aggregieren der Partikel zu eliminieren.

## Patentansprüche

1. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel, dadurch gekennzeichnet, daß lumineszierende Metall-Liganden Komplexe mit langen Lumineszenzabklingzeiten in feste Materialien Form eingebaut werden, so daß sie gegenüber chemischen Parametern der Probe abgeschirmt sind und deren Lumineszenzeigenschaften wie Quantenausbeute, spektrales Verhalten Lumineszenzabklingzeit und Polarisationsgrad von der jeweiligen Probenzusammensetzung unabhängig sind.
2. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Metall-Liganden-komplexen um Verbindungen des Ruthenium(II), Osmium(II) Rhenium(I), Iridium(III) Platin(II) und Palladium(II)als Zentralatom handelt.

3. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um Komplexe mit 2 oder 3-zähnigen Polypyridylliganden wie 2,2'-Bipyridin, Bipyrazin, Phenanthrolin, Terpyridyl oder deren Abkömmlinge handelt.
4. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um die Triskomplexe des Ruthenium(II) mit 2,2'-bipyridyl, 1,10-phenanthrolin, 4,4-diphenyl-2,2'-bipyridyl und 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline als Liganden handelt.
5. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um Carbonylkomplexe von Re(I) mit zusätzlichen Diiminliganden wie Abkömmlinge von 2,2'-Bipyridyl und 1,10-Phenanthrolin handelt.
6. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um Porphyrinkomplexe des Pt(II) sowie Pd(II) als Zentralatom handelt, die sich durch intensive Raumtemperaturphosphoreszenz auszeichnen.
7. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Einbaumatrix um organische Polymere handelt, die sich durch geringe Wasseraufnahme sowie minimaler Gaspermeabilität auszeichnen.
8. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Einbaumatrix um organische Polymere aus der Gruppe der Polyacrylnitrile, Polyacrylcopolymere, Polyvinylchlorid oder Polyvinylidenchlorid handelt.
9. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche der Partikel durch reaktive Gruppen wie COOH, NH<sub>2</sub>, OH oder SH modifiziert ist, welche die kovalente Kopplung von Fluoreszenzindikatoren und Biomolekülen ermöglichen.
10. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Einbaumatrix um Gläser handelt.

11. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Einbaumaterialien um Gläser handelt, die nach dem Sol-Gel Verfahren hergestellt werden.
12. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 11 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Einbaumaterialien um Sol-Gel Gläser handelt, die aus Silizium, Titan, Zirkonium oder Zinn-tetraalkoholaten hergestellt werden.
13. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 1 wobei die Partikel aus einer Polymerlösung in welcher der phosphoreszierende Farbstoff gelöst vorliegt, durch Zutropfen von Wasser ausgefällt werden.
14. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 13 wobei die Partikel aus einer Lösung bestehend aus Dimethylformamid und Polyacrylnitril in welcher der phosphoreszierende Farbstoff gelöst vorliegt, durch Zutropfen von Wasser ausgefällt werden.
15. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 14 wobei der Durchmesser der Partikel durch Variation des Polymergehaltes der Polymerlösung definiert eingestellt wird.
16. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 1 wobei der Farbstoff in bereits vorgefertigte Partikel aus einem Lösungsmittelgemisch durch Diffusion eingebaut wird.
17. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 1 wobei die Partikel durch Versprühen einer Polymerlösung in welcher der Lumineszenzfarbstoff gelöst vorliegt und gleichzeitiger Verdampfung des Lösungsmittels entstehen.
18. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 17 wobei der Durchmesser der Partikel durch Varierung des Polymergehaltes der Sprühlösung definiert eingestellt wird.

19. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikropartikeln wobei der Lumineszenzfarbstoff in verdichtete monolithische Sol-Gel Gläser eingebaut wird, welche anschließend gemahlen und nach Größen fraktioniert werden.
20. Verwendung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel nach den Ansprüchen 1-12 zur Markierung und fluorimetrischen Detektion von Biomolekülen aus der Gruppe der Toxine, Hormone, Hormonrezeptoren, Peptide, Proteine, Lektine, Oligonukleotide, Antikörper, Antigene, Viren und Bakterien.
21. Verwendung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel nach den Ansprüchen 1-10 als Referenzstandards zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen von fluorimetrischen Assays.
22. Verwendung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel nach den Ansprüchen 1-10 zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätsassays wobei durch die Zugabe des Referenzstandards zur Probe die Intensitätsinformation in ein Phasensignal oder einen zeitabhängigen Parameter konvertiert wird.
23. Verwendung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel nach den Ansprüchen 1-12 zur Referenzierung des Fluoreszenzintensitätssignals von optischen Fluoreszenzsensoren wobei die Partikel mit dem Fluoreszenzindikator in einer festen Phase gemeinsam immobilisiert werden.

#### ***Hintergrund der Erfindung***

Die Messung der Lumineszenz ist eine weit verbreitete Methode in der Bio- und Chemoanalytik. Ihre Attraktivität verdankt sie ihrer hohen Empfindlichkeit, der Vielseitigkeit sowie der Eliminierung der Strahlenbelastung durch radioaktive Markierungsreagenzien. In der Praxis werden in der Regel Fluoreszenzmarker eingesetzt, die sich durch eine hohe Quantenausbeute auszeichnen eingesetzt. Meist wird die Korrelation zwischen Fluoreszenzintensitätssignal sowie der Konzentration des Fluoreszenzmarkers in der Probe als Meßparameter ausgewertet. Nachteilig wirkt sich bei solchen Messungen aus, daß die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität durch eine Vielzahl von Faktoren gestört wird. Dabei kann es sich zum einen um Schwankungen der Intensität im optischen system (Lichtquelle, Detektor und optischer Weg) aber auch um intrinsische optische Eigenschaften der Probe handeln (Färbung, Trübung und Untergrundfluoreszenz) handeln. Um diese Störeinflüsse zu eliminieren, benötigt man effiziente Methoden zur Referenzierung der Fluoreszenzsignale. Eine kürzlich patentierte Methode zum Referenzieren von

Fluoreszenzsignalen beruht darauf, daß zur Probe ein phosphoreszierender Referenzstandard zugegeben wird, der ähnliche (im besten Fall identische) spektrale Eigenschaften wie der eigentliche Fluoreszenzmarker aufweist. In Kombination mit einer Frequenzmodulations- oder zeitaufgelösten Lumineszenzmessung wird auf diese Weise die Intensitätsinformation in ein Phasensignal oder einen zeitabhängigen Parameter umgewandelt. Um auf diese Weise eine fehlerfreie Referenzierung des Meßsignals zu realisieren, werden inerte phosphoreszierende Referenzstandards benötigt, deren Phosphoreszenzeigenschaften von den Probenparametern nicht beeinflußt werden. Dafür kommen zum Beispiel phosphoreszierende anorganische Feststoffe wie zum Beispiel mit Cr(III) dotierte Mischoxide in Frage, die in gepulverter Form der Probe zugemischt werden können. Besser geeignet für diesen Zweck sind jedoch Phosphoreszenzfarbstoffe, die in organische und anorganische Trägermaterialien eingebaut werden und in Form von Mikro- oder Nanopartikeln der Probe zugemischt werden. Dabei kann es sich um lumineszierende Polypyridylkomplexe mit Ru(II), Os(II), Re(I), Pt(II) oder Ir(III) als Zentralatom, oder phosphoreszierende Porphyrine des Pt(II) oder Pd(II) oder Komplexe der Seltenerdenmetalle wie Tb(III) oder Eu(III) handeln.

Eine weitere weitverbreitete Methode um lumineszenzmarkierte Moleküle sehr empfindlich und ohne Störung durch Eigenfluoreszenz der Probe nachzuweisen, besteht darin, Lumineszenzmarker zu verwenden, die sich durch lange Abklingzeiten auszeichnen. Deren Signal läßt sich durch zeitaufgelöste Messung leicht vom Untergrundsignal abtrennen. Es können wiederum dieselben Phosphoreszenzfarbstoffe zum Einsatz kommen.

Für beide beschriebenen Methoden ist es notwendig, daß die photophysikalischen Eigenschaften des Phosphoreszenzfarbstoffs nicht von den Probenparametern beeinflußt werden. Werden solche Farbstoffe der Probe im gelösten Zustand zugegeben, sind diese Voraussetzungen nicht gegeben. Insbesondere Phosphoreszenzlösung durch molekularen Sauerstoff sowie oxydative und reduktive Löscher bewirken Fehlinterpretationen des Meßsignals.

Um inerte Phosphoreszenzstandards und Phosphoreszenzmarker zur Verfügung zu haben, müssen die Phosphoreszenzfarbstoffe in feste Materialien eingebaut werden, damit sie mit der Probe nicht in Wechselwirkung treten können.

Die Erfindung beschreibt sowohl die Zusammensetzung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln deren photophysikalische Eigenschaften nicht von der Zusammensetzung der Probe abhängen als auch Verfahren zu deren Herstellung. Es werden außerdem Anwendungsmöglichkeiten als Phosphoreszenzstandard und Phosphoreszenzmarker beschrieben.

Als geeignete Einbettungsmaterialien für phosphoreszierende Farbstoffe haben sich Gläser erwiesen, die nach dem Sol-Gel Verfahren hergestellt werden. Die Herstellung solcher Gläser nach Standardmethoden führt zu Materialien, die durch eine mikroporöse Struktur gekennzeichnet sind. Eingebaute Farbstoffe sind damit für gelöste Probenbestandteile und insbesondere Sauerstoff zugänglich und können damit gelöscht werden. Die in dieser Erfindung beschriebenen Sol-Gläser werden aus diesem Grund durch Erhitzen auf eine Temperatur von 200°C in einem besonderen Schritt der Herstellung verdichtet. Nach der Hydrolyse des Sol-Gel Precursors Tetamethoxysilan wird unter Vakuum sofort das Lösungsmittel abgezogen und das Sol-Gel noch vor der endgültigen Vernetzung getrocknet. Auf diese Weise entsteht eine dichte nichtporöse Glasmatrix. Biomoleküle sowie chemische Verbindungen können in diese dichte Matrix nicht eindringen und beeinflussen damit nicht die Lumineszenzeigenschaften der eingebauten Farbstoffe. Es wurden inerte phosphoreszierende Sol-Gel Gläser mit den Farbstoffen Ruthenium(II)-tris-1,10-phenanthrolin sowie Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin mit Farbstoffgehalten bis zu 40 mM (bezogen auf kg SiO<sub>2</sub>) nach diesem Verfahren hergestellt. Diese Materialien zeichnen sich durch intensive Raumtemperaturphosphoreszenz aus, die durch Sauerstoff nicht gelöscht wird. Da im Herstellungsprozess die Sol Gel Phosphore entweder in monolithischer Form oder als dünne Filme entstehen müssen Mikropartikel durch anschließendes Pulverisieren hergestellt werden. Anschließende Silanisierung der Partikel führt zu reaktiven Oberflächen, die zum kovalenten Koppeln von Biomolekülen genutzt werden können. Die Oberfläche der Partikel kann sowohl mit Amino, Epoxy oder Carboxylgruppen versehen werden.

Eine Alternative zur Herstellung von inerten Phosphoreszenzpartikeln besteht darin, organische Polymere als Einbettungsmatrix zu verwenden, die sich zum einen durch eine sehr geringe Gaspermeabilität (zum Ausschluss von Sauerstoff) und zum anderen durch eine minimale Wasseraufnahme (um das Eindringen ionischer Verbindungen zu verhindern) auszeichnen. Geeignete Polymere sind Polyvinylchlorid, Polyvinylidenchlorid und insbesondere Polyacrylnitril.

Polyacrylnitril besitzt eine extrem geringe Gaspermeabilität, teilweise hydrophile Eigenschaften und eine sehr geringe Aufnahmekapazität für Wasser (ca. 1%). Außerdem können die Nitrilgruppen des Polymers problemlos zu Carboxylgruppen verseift werden, die dann für die kovalente Bindung von diversen Biomolekülen zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund ist Polyacrylnitril die optimale Einbettungsmatrix für Phosphoreszenzfarbstoffe als Basis für inerte Nano- und Mikropartikel.

Die Herstellung phosphoreszierender Mikro- und Nanopartikel auf der Basis von Polyacrylnitril (PAN) kann auf verschiedenen Wegen erfolgen.

- A. Ausfällung der Partikel aus einer Lösung von PAN in Dimethylformamid durch kontrolliertes Zutropfen von Wasser. Die Polymerlösung enthält gleichzeitig den gelösten Phosphoreszenzfarbstoff.
- B. Ausfällung der Partikel aus einer Lösung von PAN in Dimethylformamid durch kontrolliertes Zutropfen von Wasser. Die Polymerlösung enthält keinen gelösten Phosphoreszenzfarbstoff. Der Phosphoreszenzfarbstoff wird nachträglich durch Diffusion in die Partikel eingetragen.
- C. Herstellung der Partikel durch Sprühen einer PAN/Dimethylformamidlösung, die den gelösten Phosphoreszenzfarbstoff enthält in Wasser oder Ethanol.

In allen Vorschriften kann der Durchmesser der Partikel durch Veränderung des Anteils an Polyacrylamid in der Dimethylformamidlösung gezielt eingestellt werden. Mit abnehmendem Anteil an Polyacrylamid reduziert sich auch der Durchmesser der Partikel. Es können Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 50 nm hergestellt werden.

Nach der Herstellung und Isolierung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel erfolgt die Aktivierung der Oberfläche mit reaktiven Carboxylgruppen. Dies erfolgt durch Verseifung der oberflächengebundenen Nitrilgruppen in konzentrierter Natronlauge.

Die Carboxylgruppen werden aus zwei Gründen benötigt. Zum einen können so stabile Dispersionen in gepufferten Systemen hergestellt werden und zum anderen Biomoleküle an der Oberfläche kovalent gebunden werden.

Die Mikro- und Nanopartikel können zum einen als phosphoreszierende Referenzstandards zur Konvertierung von Intensitätssignalen in Phasensignale und zum anderen als Phosphoreszenzmarker für die hochempfindliche Detektion von Biomolekülen eingesetzt werden.

### **Herstellungsvorschriften**

#### ***Herstellung von phosphoreszierenden Nanopartikeln aus Polyacrylnitril und Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthrolin***

Ein Gramm n-Polyacrylnitril wird zusammen mit 10 Milligramm Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthrolin Perchlorat in 100 ml Dimethylformamid gelöst und in ein 1 l Becherglas gefüllt. Zu dieser Lösung wird 400 ml H<sub>2</sub>O unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Es entsteht eine leichte Trübung in der Lösung. Anschließend wird 10 ml einer 5%igen Natriumchloridlösung ebenfalls unter ständigen Rühren zugegeben. Dabei entsteht ein flockiger Niederschlag, der sich über Nacht am Boden des Becherglases absetzt. Dieser Niederschlag enthält den gesamten Farbstoff und wird durch Zentrifugieren abgetrennt und

anschließend dreimal mit 250 ml einer 0,5%igen NaCl-Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt wird der Niederschlag mit 200 ml Ethanol gewaschen, um den an der Oberfläche adsorbierten Phosphoreszenzfarbstoff vollständig auszuwaschen. Der Ethanol wird durch Zentrifugieren vom Niederschlag abgetrennt. Anschließend erfolgt ein letzter Waschschritt in einer 0,05%igen NaCl-Lösung. Der Niederschlag, der die Nanopartikel enthält, wird abgetrennt und in 50 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### ***Herstellung von phosphoreszierenden Nanopartikeln aus Polyacrylnitril und Ruthenium(II)-tris-1,10 phenanthrolin***

Ein Gramm n-Polyacrylnitril wird zusammen mit 10 Milligramm Ruthenium(II)-tris-1,10 phenanthrolin Hexafluorophosphat in 100 ml Dimethylformamid gelöst und in ein 1 l Becherglas gefüllt. Zu dieser Lösung wird 400 ml H<sub>2</sub>O unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Es entsteht eine leichte Trübung in der Lösung. Anschließend wird 10 ml einer 5%igen Natriumchloridlösung ebenfalls unter ständigen Rühren zugegeben. Dabei entsteht ein flockiger Niederschlag, der sich über Nacht am Boden des Becherglases absetzt. Dieser Niederschlag enthält ca. 90% des eingesetzten Farbstoffs und wird durch Zentrifugieren abgetrennt und anschließend dreimal mit 250 ml einer 0,5%igen NaCl-Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt wird der Niederschlag mit 200 ml Ethanol gewaschen, um den an der Oberfläche adsorbierten Phosphoreszenzfarbstoff vollständig auszuwaschen. Der Ethanol wird durch Zentrifugieren vom Niederschlag abgetrennt. Anschließend erfolgt ein letzter Waschschritt in einer 0,05%igen NaCl-Lösung. Der Niederschlag mit den Nanopartikeln wird abgetrennt und in 50 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### ***Carboxylierung der Oberfläche der phosphoreszierenden Nanopartikel***

10 ml der Partikelsuspension aus Absatz A oder B mit einem mit einem Feststoffgehalt von 200 mg Polyacrylnitril wird in 50 ml einer 5%igen NaOH-Lösung aufgenommen. Die Partikelö fallen als flockiger Niederschlag aus. Die Lösung wird für 45 Minuten unter intensiven Rühren auf 75°C erhitzt. Intensiver Geruch nach Ammoniak zeigt die Verseifung der Nitrilgruppen an. Nach Aufklären der trüben Lösung wird die Natronlauge durch Zugabe von HCl neutralisiert und auf pH 3 eingestellt. Dabei fallen die carboxylierten Partikel wiederum als Niederschlag aus und können abzentrifugiert werden. Abschließend werden sie in 50 ml Puffer pH 3 gewaschen, abzentrifugiert und in 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen.



# **FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**

## **Certificate**

Herr Dr. Ingo Klimant  
of  
Regensburg/Germany

RECEIVED  
OCT 01 2003  
TC 1700

have filed a Patent Application under the title:

## “Phosphorescent micro- and nanoparticles as reference standard and phosphorescent marker”

on 15 July 1999 at the German Patent and Trademark Office.

The attached document is a correct and accurate reproduction of the original submission for this Patent Application.

The German Patent and Trademark Office has for the time being given the Application the symbols C 09 K and G 01 N of the International Patent Classification.

Munich, 30 May 2000

## German Patent and Trademark Office

## The President

pp

Dzierzon

File No: 199 33 104.9

**Phosphorescent micro- and nanoparticles as reference standard and phosphorescent marker**

**Abstract**

5

The patent describes the composition, preparation and use of phosphorescent micro- and nanoparticles. These particles can be used either as internal phosphorescence standards for referencing fluorescent signals, or as phosphorescent markers for the labeling and detection of biomolecules. Phosphorescent dyes are incorporated in inert form into solid materials, that is to say shielded from the influence of chemical and biological compounds in aqueous sample constituents. In this incorporated form, the photophysical properties of the dyes (spectral characteristics, phosphorescence quantum yield, phosphorescence decay time and polarization) remain unaffected by changing sample parameters.

20

Dense inorganic materials or organic polymers which, because of their structure, preclude uptake of biomolecules small neutral molecules and ionic compounds are selected as incorporation matrix. In particular, the interfering effect of molecular oxygen, an efficient phosphorescence quencher, on phosphorescence measurements is eliminated in this way. The surface of the nano- and microparticles can be provided with reactive surfaces in order to make covalent coupling of biomolecules possible and to eliminate aggregation of the particles.

**Claims**

35 1. Phosphorescent micro- and nanoparticles, characterized in that luminescent metal-ligand complexes with long luminescence decay times are incorporated into solid materials form so that they are shielded from chemical parameters of the

sample, and their luminescence properties such as quantum yield, spectral characteristics luminescence decay time and degree of polarization are independent of the particular composition of the sample.

- 5 2. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 1, characterized in that the luminescent metal-ligand complexes are compounds of ruthenium(II), osmium(II), rhenium(I), iridium(III) platinum(II) and palladium(II) as central atom.
- 10 3. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 2, characterized in that the luminescent compounds are complexes with bi or tridentate polypyridyl ligands such as 2,2'-bipyridine, bipyrazine, phenanthroline, terpyridyl or derivatives thereof.
- 15 4. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 3, characterized in that the luminescent compounds are the tris complexes of ruthenium(II) with 2,2'-bipyridyl, 1,10-phenanthroline, 4,4-diphenyl-2,2'-bipyridyl and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline as ligands.
- 20 5. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 2, characterized in that the luminescent compounds are carbonyl complexes of Re(I) with additional diimine ligands such as derivatives of 2,2'-bipyridyl and 1,10-phenanthroline.
- 25 6. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 2, characterized in that the luminescent compounds are porphyrin complexes of Pt(II) and Pd(II) as central atom which are distinguished by intense room-temperature phosphorescence.

7. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 1, characterized in that the incorporation matrix comprises organic polymers which are distinguished by low water uptake and minimal gas permeability.  
5
8. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 3, characterized in that the incorporation matrix comprises organic polymers from the group of polyacrylonitriles, polyacrylic copolymers, polyvinyl chloride or polyvinylidene chloride.  
10
9. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 3, characterized in that the surface of the particles is modified by reactive groups such as COOH, NH<sub>2</sub>, OH or SH which make the covalent coupling of fluorescence indicators and biomolecules possible.  
15
10. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 1, characterized in that the incorporation matrix comprises glasses.  
20
11. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 10, characterized in that the incorporation materials are glasses which are produced by the sol-gel process.  
25
12. Phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 11, characterized in that the incorporation materials are sol-gel glasses which are produced from silicon, titanium, zirconium or tin tetraalcohohlates.  
30
13. A process for producing phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 1, where the particles are precipitated from a polymer solution  
35

in which the phosphorescent dye is present in solution by dropwise addition of water.

14. The process for producing phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 13, where the particles are precipitated from a solution consisting of dimethylformamide and polyacrylonitrile in which the phosphorescent dye is present in solution by dropwise addition of water.
15. The process for producing phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 14, where the diameter of the particles is adjusted in a defined manner by varying the polymer content of the polymer solution.
16. A process for producing phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 1, where the dye is incorporated into previously fabricated particles from a solvent mixture by diffusion.
17. A process for producing phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 1, where the particles are generated by spraying a polymer solution in which the luminescent dye is present in solution and simultaneously evaporating the solvent.
18. The process for producing phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claim 17, where the diameter of the particles is adjusted in a defined manner by varying the polymer content of the spray solution.
19. A process for producing phosphorescent microparticles, where the luminescent dye is incorporated into compacted monolithic sol-gel

glasses which are subsequently ground and fractionated according to sizes.

20. The use of the phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claims 1-12 for the labeling and fluorimetric detection of biomolecules from the group of toxins, hormones, hormone receptors, peptides, proteins, lectins, oligonucleotides, antibodies, antigens, viruses and bacteria.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
21. The use of the phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claims 1-10 as reference standards for referencing fluorescence intensity signals from fluorimetric assays.
22. The use of the phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claims 1-10 for referencing fluorescence intensity assays, where the intensity information is converted into a phase signal or a time-dependent parameter through the addition of the reference standard to the sample.
23. The use of the phosphorescent micro- and nanoparticles as claimed in claims 1-12 for referencing the fluorescence intensity signal from optical fluorescence sensors, where the particles are immobilized together with the fluorescence indicator in a solid phase.

***Background of the invention***

Measurement of luminescence is a widespread method in bioanalysis and chemical analysis. Its attraction derives from its sensitivity, the versatility and the elimination of radiation exposure due to radioactive labeling reagents. In practice, fluorescent markers which are distinguished by a high quantum yield are

35

employed usually employed. In most cases, the correlation between fluorescence intensity signal and the concentration of the fluorescent marker in the sample is evaluated as measurement parameter. A 5 disadvantageous effect on such measurements is that a large number of factors interfere with quantitative evaluation of the fluorescence intensity. This may involve on the one hand variations in the intensity in the optical system (light source, detector and optical 10 paths) but also intrinsic optical properties of the sample (color, turbidity and background fluorescence). In order to eliminate these interfering effects there is a need for efficient methods for referencing the 15 fluorescence signals. A recently patented method for referencing fluorescent signals is based on addition of a phosphorescent reference standard which has similar (in the best case identical) spectral properties to the actual fluorescent marker to the sample. In this way, in combination with a frequency modulation or time- 20 resolved luminescence measurement, the intensity information is transformed into a phase signal or a time-dependent parameter. In order to achieve in this way an error-free referencing of the measured signal there is a need for inert phosphorescent reference 25 standards whose phosphorescence properties are unaffected by the sample parameters. Examples suitable for this purpose are phosphorescent inorganic solids such as, for example, Cr(III)-doped mixed oxides which can be admixed in powdered form with the sample. 30 However, more suitable for this purpose are phosphorescent dyes which are incorporated into organic and inorganic carrier materials and are admixed in the form of micro- or nanoparticles with the sample. Possibilities in this connection are luminescent 35 polypyridyl complexes with Ru(II), Os(II), Re(I), Pt(II) or Ir(III) as central atom, or phosphorescent porphyrins of Pt(II) or Pd(II) or complexes of the rare earth metals such as Tb(III) or Eu(III).

A further widespread method for very sensitive detection, without interference from the sample's intrinsic fluorescence, of luminescence-labeled molecules consists of using luminescent markers which

5 are distinguished by long decay times. Their signal can easily be separated from the background signal by time-resolved measurement. The same phosphorescent dyes can again be employed.

10 For both the methods described, it is necessary for the photophysical properties of the phosphorescent dye to be unaffected by the sample parameters. If such dyes are added to the sample in the dissolved state, these preconditions are not met. In particular,

15 phosphorescence quenching by molecular oxygen and oxidative and reductive quenchers bring about misinterpretations of the measured signal.

20 In order to have phosphorescence standards and phosphorescent markers available, the phosphorescent dyes must be incorporated into solid materials so that they cannot interact with the sample.

25 The invention describes both the composition of phosphorescent micro- and nanoparticles whose photophysical properties do not depend on the composition of the sample, and processes for the production thereof. In addition, possible uses as phosphorescence standard and phosphorescence marker are described.

30 Embedding materials which have proved suitable for phosphorescent dyes are glasses produced by the sol-gel process. Production of such glasses by standard methods leads to materials which are characterized by a

35 microporous structure. Incorporated dyes are thus accessible by dissolved sample constituents and, in particular, oxygen and can thus be quenched. The sol glasses described in this invention are for this reason compacted by heating to a temperature of 200°C in a

special production step. Hydrolysis of the sol-gel precursor tetamethoxysilane is followed by immediate stripping off of the solvent in vacuo, and drying of the sol-gel also before the final crosslinking. A dense  
5 nonporous glass matrix is generated in this way. Biomolecules and chemical compounds are unable to penetrate into this dense matrix and thus do not affect the luminescence properties of the incorporated dyes. Inert phosphorescent sol-gel glasses have been produced  
10 by this process with the dyes ruthenium(II) tris-1,10-phenanthroline and ruthenium(II) tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline with dye contents of up to 40 mM (based on kg of SiO<sub>2</sub>). These materials are distinguished by intense room-temperature  
15 phosphorescence which is not quenched by oxygen. Since the production process generates the sol-gel phosphors either in monolithic form or as thin films it is necessary for microparticles to be produced by subsequent pulverization. Subsequent silanization of  
20 the particles leads to reactive surfaces which can be used for covalent coupling of biomolecules. The surface of the particles can be provided either with amino, epoxy or carboxyl groups.  
25 An alternative to the production of inert phosphorescent particles is to use organic polymers as embedding matrix which are distinguished on the one hand by a very low gas permeability (to exclude oxygen) and on the other hand by a minimal water uptake (in  
30 order to prevent ionic compounds penetrating in). Suitable polymers are polyvinyl chloride, polyvinylidene chloride and, in particular, polyacrylonitrile.  
35 Polyacrylonitrile has an extremely low gas permeability, in some cases hydrophilic properties and a very low uptake capacity for water (about 1%). In addition, the nitrile groups of the polymer can be hydrolyzed without difficulty to carboxyl groups which

are then available for covalent bonding of various biomolecules. For this reason, polyacrylonitrile is the optimal embedding matrix for phosphorescent dyes as basis for inert nano- and microparticles.

5

Phosphorescent micro- and nanoparticles based on polyacrylonitrile (PAN) can be produced in various ways.

10 A. Precipitation of the particles from a solution of PAN in dimethylformamide by controlled dropwise addition of water. The polymer solution simultaneously contains the dissolved phosphorescent dye.

15

B. Precipitation of the particles from a solution of PAN in dimethylformamide by controlled dropwise addition of water. The polymer solution contains no dissolved phosphorescent dye. The phosphorescent dye is subsequently introduced into the particles by diffusion.

20

C. Production of the particles by spraying a PAN/dimethylformamide solution which contains the dissolved phosphorescent dye in water or ethanol.

25

In all the methods, the diameter of the particles can be adjusted in a targeted manner by altering the content of polyacrylamide in the dimethylformamide solution. As the polyacrylamide content decreases there is also a reduction in the diameter of the particles. Particles with a diameter of less than 50 nm can be produced.

35

After the production and isolation of the phosphorescent micro- and nanoparticles, the surface is activated with reactive carboxyl groups. This takes place by hydrolysis of the surface-bound nitrile groups in concentrated sodium hydroxide solution.

The carboxyl groups are required for two reasons. On the one hand, it is possible in this way to produce stable dispersions in buffered systems, and on the other hand biomolecules can be covalently bonded to the 5 surface.

The micro- and nanoparticles can be employed on the one hand as phosphorescent reference standards for 10 converting intensity signals into phase signals and on the other hand as phosphorescent markers for highly sensitive detection of biomolecules.

#### **Production methods**

15 ***Production of phosphorescent nanoparticles from polyacrylonitrile and ruthenium(II) tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthroline***

One gram of n-polyacrylonitrile is dissolved together 20 with 10 milligram of ruthenium(II) tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthroline perchlorate in 100 ml of dimethylformamide and introduced into a 1 l glass beaker. 400 ml of H<sub>2</sub>O is slowly added dropwise to this solution while stirring continuously. A slight 25 turbidity is generated in the solution. Subsequently, 10 ml of a 5% strength sodium chloride solution is added, likewise while stirring continuously. This results in a flocculant precipitate which settles onto the bottom of the glass beaker overnight. This 30 precipitate contains all the dye and is removed by centrifugation and subsequently washed three times with 250 ml of a 0.5% strength NaCl solution. In the next step, the precipitate is washed with 200 ml of ethanol in order to wash out completely the phosphorescent dye 35 adsorbed onto the surface. The ethanol is removed from the precipitate by centrifugation. This is followed by a last washing step in a 0.05% strength NaCl solution. The precipitate, which contains the nanoparticles, is removed and taken up in 50 ml of H<sub>2</sub>O.

**Production of phosphorescent nanoparticles from polyacrylonitrile and ruthenium(II) tris-1,10 phenanthroline**

5 One gram of n-polyacrylonitrile is dissolved together with 10 milligram of ruthenium(II) tris-1,10 phenanthroline hexafluorophosphate in 100 ml of dimethylformamide and introduced into a 1 l glass beaker. 400 ml of H<sub>2</sub>O is slowly added dropwise to this  
10 solution while stirring continuously. A slight turbidity is generated in the solution. Subsequently, 10 ml of a 5% strength sodium chloride solution is added, likewise while stirring continuously. This results in a flocculant precipitate which settles onto  
15 the bottom of the glass beaker overnight. This precipitate contains about 90% of the dye employed and is removed by centrifugation and subsequently washed three times with 250 ml of a 0.5% strength NaCl solution. In the next step, the precipitate is washed  
20 with 200 ml of ethanol in order to wash out completely the phosphorescent dye adsorbed onto the surface. The ethanol is removed from the precipitate by centrifugation. This is followed by a last washing step in a 0.05% strength NaCl solution. The precipitate,  
25 which contains the nanoparticles, is removed and taken up in 50 ml of H<sub>2</sub>O.

**Carboxylation of the surface of the phosphorescent nanoparticles**

30 10 ml of the particle suspension from paragraph A or B with a with a solids content of 200 mg of polyacrylonitrile is taken up in 50 ml of a 5% strength NaOH solution. The particles precipitate as a  
35 flocculant precipitate. The solution is heated at 75°C with vigorous stirring for 45 minutes. An intense odor of ammonia indicates the hydrolysis of the nitrile groups. After clarification of the turbid solution, the sodium hydroxide solution is neutralized and adjusted

to pH 3 by adding HCl. This precipitates the carboxylated particles again as precipitate and they can be removed by centrifugation. Finally, they are washed in in 50 ml of buffer of pH 3, removed by 5 centrifugation and taken up in 10 ml of distilled water.